

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problems Mailbox.**

⑨ 日本国特許庁(JP)

⑩ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A)

平2-273200

⑬ Int. Cl.<sup>5</sup>

識別記号

庁内整理番号

⑭ 公開 平成2年(1990)11月7日

C 12 Q 1/42  
1/68  
G 01 N 33/532  
33/536

A 6807-4B  
B 6807-4B  
C 7906-2C  
7906-2C

審査請求 未請求 請求項の数 12 (全 8 頁)

⑮ 発明の名称 化学発光の測定方法

⑯ 特 願 平1-184432

⑰ 出 願 平1(1989)7月19日

優先権主張 ⑱ 昭63(1988)7月19日 ⑲ 日本(JP) ⑳ 特願 昭63-178194

㉑ 発 明 者 岡 田 政 久 東京都新宿区下落合4丁目6番7号 富士レビオ株式会社  
内  
㉒ 発 明 者 芦 原 義 弘 東京都新宿区下落合4丁目6番7号 富士レビオ株式会社  
内  
㉓ 発 明 者 二 宮 忠 司 東京都新宿区下落合4丁目6番7号 富士レビオ株式会社  
内  
㉔ 発 明 者 矢 野 朗 東京都新宿区下落合4丁目6番7号 富士レビオ株式会社  
内  
㉕ 出 願 人 富士レビオ株式会社 東京都新宿区下落合4丁目6番7号

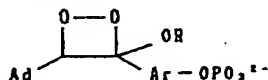
明 細 書

1. 発明の名称

化学発光の測定方法

2. 特許請求の範囲

(1) 固相を用いる化学発光の測定方法において、  
酵素として酸又はアルカリホスファターゼ及び基  
質として一般式



で表されるジオキセタン誘導体を用い、pH 4 ~ pH  
10.5で酵素反応させた後、その固相のみをアル  
カリ条件で発光反応させる該測定方法(式中、Ad  
はアダマンチル基、Rは低級アルキル基であり、  
Arは芳香族基である。)

(2) 化学発光測定法を酵素免疫測定法に用いた、  
特許請求の範囲第(1)項に記載の方法。

(3) 化学発光測定法をポリスクレオチド測定法  
に用いた、特許請求の範囲第(1)項に記載の方法。

(4) 酵素反応を停止剤を添加し、反応を停止さ  
せた後にアルカリにおいて発光反応を行う、特許

請求の範囲第(1)、(2)又は(3)項に記載の方法。

(5) 停止剤が酵素阻害剤又は酸である、特許請  
求の範囲第(4)項に記載の方法。

(6) アルカリで反応を行う際にエンハンサーを  
共存させる、特許請求の範囲第(1)、(2)又は(3)項に  
記載の方法。

(7) エンハンサーがタンパク、ポリアルキル4  
級アミン又は蛍光剤である、特許請求の範囲第(6)  
項に記載の方法。

(8) タンパクがBSA、HSA、ヒト免疫グロブリン  
又は卵白アルブミンである、特許請求の範囲第  
(7)項に記載の方法。

(9) 蛍光剤がフルオレッセイン、シス-ジクロ  
ロビス(2,2'-ビピリジン)ルテニウム(II)  
ハイドレート又は4-フルオロ-7-ニトロベン  
ゾフラザン、7-フルオロ-4-ニトロベンゾキ  
サジアゾールとアミン、アミノ酸、ペプチド若し  
くは蛋白質との結合物又はその誘導体である、特  
許請求の範囲第(7)項に記載の方法。

⑳ 固相発光を有機溶媒中で行なう特許請求の

範囲第(1)、(2)又は(3)記載の方法。

00 有鍍溶媒がクロロホルム、ベンゼン、ベンジルアルコール、メタキシレン、あるいはジメチルホルムキシドである特許請求の範囲第(1)、(2)又は(3)記載の方法。

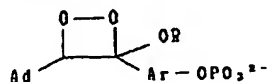
02 固相がポリスチレン、ポリフルオロエチレン、ナイロン、ポリアクリロニトリル、ジュラコン、ポリメチルペンテン、又はポリアセタールである特許請求の範囲第(7)項記載の方法。

### 3. 発明の詳細な説明

(発明の技術分野)

本発明は、固相を用いる化学発光の測定方法に関する。

更に詳しくは、酵素として酸又はアルカリホスファターゼ及び基質として一般式



(式中、Adはアダマンチル基、Rは低級アルキル基であり、Arは芳香族基である。)で表されるジオキセタン誘導体を用い、pH 4 ~ pH 10.5で酵素

クテリアルシフェラーゼによるNADHの測定

(Hastings, J.W. et al., Annu. Rev. Microbiol., 31, 549(1977))等が知られている。

(発明が解決しようとする問題点)

しかしながら、前記した化学発光法①の方法は、発光に使用する酸化剤で試料が分解したり、酸化剤自体が分解するため正確な測定ができない、②の方法は、発光に使用する試薬の水溶性が低く、水系での測定は困難である、③の方法は、発光反応が間接的であるため測定のタイミングをとるために熟慮さを要求される、などの欠点を有している。又、前記した生物発光法(イ)(ロ)及び(ハ)の方法は化学発光に比べると使用する酵素が極めて高価であったり、免疫測定法に利用すると酵素が失活するなどの欠点を有している。

(問題点を解決するための手段)

本発明者等は、高感度、高精度、簡便な化学発光測定法を見出すべく検討した結果、本発明を見出すに至ったものである。

本発明は、固相を用いる化学発光であって酵素

反応させた後、その固相のみをアルカリ条件で発光反応させる、化学発光の測定方法に関する。

(従来の技術)

発光測定法には化学発光および生物発光反応にもとづくものがあり、高感度な超微量分析法として利用されている。例えば化学発光測定法では、①アルカリ存在下、ルミノール/フェリシアン化カリウムによる $\text{H}_2\text{O}_2$ の測定(Bostick et al., Anal. Chem., 47, 447-452(1975)) ②ルミノール-グルコースオキシダーゼによるグルコースの測定及び(Bostick et al., Anal. Chem., 47, 447-452(1975)) ③アルカリ存在下、ルミノール/ $\text{H}_2\text{O}_2$ によるヘモグロビンの測定(Ewertz, L. et al., Anal. Biochem., 71, 564-570(1976))等が知られている。一方、生物発光測定法には、(イ)ホタルの発光酵素ルシフェリン-ルシフェラーゼによるATPの測定(Addanki et al., Anal. Biochem., 14, 261-264(1966))、(ロ)アクエオリンによる細胞遊離カルシウムイオンの測定(Blinks et al., Pharmacol. Rev., 28, 1-93(1976))及び(ハ)バ

として酸又はアルカリホスファターゼ及び基質として前記一般式(1)で表されるジオキセタン誘導体を用い、pH 4 ~ pH 10.5において酵素反応させた後、更に固相のみをアルカリ条件とすることにより発光反応を行なう化学発光測定法である。

本発明における固相とは、測定系中に存在させる固体であって、例えば後述する免疫測定の際には抗体が結合した固体などであり、いかなる固体であってもよく、その形状等も何等限定されるものではない。固相として存在させるための好ましい材料としては、ポリスチレン、ポリフルオロエチレン、ナイロン、ポリアセタールである。

本発明の化学発光測定法は、酵素として酸又はアルカリホスファターゼを用いるものである。これらのホスファターゼは、動物あるいは植物から分離精製し、得ることができるが市販品であっても何ら差支えない。

本発明に用いる基質は、前記一般式(1)で表されるジオキセタン誘導体である。ジオキセタン誘導体は、例えばヨーロッパ特許公開254051、

PCT 公開WO 8800695号、Tetrahedron Lett., 28 1155-1158(1987)に記載の方法と同様にして製造することができる。前記一般式中のRとしては、メチル基、エチル基、プロピル基、ブチル基等の低級アルキル基を、Arとしては、フェニレン基、ナフチル基、アントラニル基等の芳香族基を例示することができる。

尚、前記一般式(1)で表されるジオキセタン誘導体の陽イオンとしてはナトリウム、カリウム等のアルカリ金属、アンモニウム、 $N(R^1)_4^+$ （式中、 $R^1$ は、メチル、エチル等のアルキル基、ベンジル等のアラルキル基を表わす。）で表される四級アンモニウムを例示することができる。

本発明における酵素反応は、pH 4～pH 10.5において行うことを必須の要件とするものであるが酸ホスファターゼの場合は、pH 4～pH 7で酵素反応することが好ましく、アルカリホスファターゼの場合はpH 7～pH 10.5で酵素反応することが好ましい。即ち、前記したホスファターゼの至適pH内において酵素反応を行うものである。

開させることもできる。

次いで、本発明は、固相のみをアルカリ条件とすることにより発光反応を行い、得られる化学発光を測定するものである。「固相のみ」とは酵素反応後に、反応溶液を除去し、例えば水等で洗浄した固相を指すものである。本発明におけるアルカリ条件とはpH 8以上を指すものであり、より好ましくはpH 10以上である。アルカリ条件の設定は、NaOH、KOH、 $Mg(OH)_2$ などのアルカリ金属あるいはアルカリ土類金属の水酸化物、水酸化アンモニウム、エタノールアミン等の水酸化物イオンを有する化合物を系中に添加することにより行うことができる。

アルカリ条件設定と同時に発光反応が開始されるが、発光量の測定は、市販されているルミノメーターを用いて容易に測定することができる。

尚、この発光反応は、酸性条件にすることにより反応が停止され、再びもとの反応条件にもどすことにより発光反応が再開される。即ち、本発光反応は条件設定することによりON-OFF状態

本発明は、酵素反応後更にアルカリ条件下において発光反応を行い化学発光を誘導するものである。酵素反応の終了は、基質の反応した程度により判断するものであるが酵素の存在量と基質の量との関係などを考慮し、適宜決定すればよい。

又、この反応の終了は、停止剤を添加し、強制的に行うこともできる。ここで停止剤として使用できるものとして、酵素阻害剤、例えば、EDTA、EGTA等のキレート化剤、フェニルリン酸エステル、ナフチルリン酸エステル等の有機リン酸エステルあるいはオルト正リン酸等の無機リン酸を挙げることができる。停止剤の使用量は、酵素阻害剤のKIを考慮し、その10倍以上が好ましく例えば、EDTAの場合は1mM以上であり、又、フェニルリン酸エステルの場合は30mM以上である。

尚、酵素としてアルカリホスファターゼを使用している場合は、酸性条件に設定することにより酵素反応を停止することができる。この場合には、再び前記した如くのアルカリホスファターゼの至適pH内に条件を設定することにより酵素反応を再

の反応を行なわせることができる。

又、本発光反応を行う際には、タンパク、ポリアルキル4級アミン、蛍光剤、ジメチルスルホキシド等をエンハンサーとして用いることができる。タンパクとしては、例えば、BSA、HSA、ヒト免疫グロブリン、卵白アルブミン等を使用することができる。又、ポリアルキル4級アミンとしては、例えば、ポリジアリールジメチルアンモニウムクロライド（以下PDDACと記す）、ポリ（ビニルベンジル（ベンジルジメチルアンモニウムクロライド））（以下BDHQと記す）等を使用することができる。更に、蛍光剤としては、例えば、フルオレッセイン、シス-ジクロロビス（2, 2'-ビピリジン）ルテニウム(II)ハイドレート（以下TBR-Cと記す）又は4-フルオロ-7-ニトロベンゾフラザン（以下NBD-Fと記す）、7-フルオロ-4-ニトロベンゾキサジアゾール（以下NBD-Cと記す）とアミン、アミノ酸、ペプチド若しくは蛋白質との結合物又は誘導体等を使用することができる。エンハンサーの使用量は、発光反

応系の0.0001wt%~10wt%である。更に、本発光反応は、発光量が多く得られる点で有機溶媒中で行うことが好ましい。有機溶媒としては、例えば、クロロホルム、ベンゼン、ベンジルアルコール、メタキシレン、ジメチルスルホキシド等を使用することができる。

本発明は酵素免疫測定法として採用することができる。その際測定できる抗原としては、血清あるいは尿などに含まれる薬物、ホルモンあるいは各種疾患に由来する微量成分などである。又、使用する抗体は、公知の方法に従い取得したものを使用することができる。例えば、兎、山羊、馬、モルモット、ニワトリなどの温血動物に、リガンド又は酵素を体重1kg当り0.3~2mg程度1~数回背中皮下、フットパッド、大腿筋等にアジュバントとともに注射して当該動物の体内に抗体を形成させることができる。得られた抗体はペプシン等の蛋白分解酵素でF(ab')<sub>2</sub>、Fab'、Fabなどに分解して用いることもできる。

一方、モノクローナル抗体として取得すること

もできる。その場合には、マウスに前記のリガンドあるいは酵素をアジュバントとともに数回腹腔等に注射し、脾臓細胞を取り出してポリエチレングリコール等を用いてマウスミエローマ細胞と融合させる。そして、この融合細胞のなかから当該抗体を産生するものをクローニングによってモノクローン細胞として増殖させ、得られたモノクローン細胞をマウス腹腔中で増殖させることによって得たモノクローナル抗体を使用することができる。

免疫測定のための方法としては、「酵素免疫測定法」医学書院(1987年版)に記載の各方法、例えば固定化抗体上に抗原を反応させその抗原に酵素標識した抗体を反応させ測定する方法等を採用することができる。

又、本発明は、ポリヌクレオチド測定法として採用することができる。その方法としては、「Molecular and Cellular Probe」Vol. 1 177(1987)に記載の各方法、例えばニトロセルロースフィルターに固定させた検体のDNAにハプテン標識相補プ

ローブDNAを反応させ、さらに抗ハプテン抗体アルカリホスファターゼ結合体を作用させる。このアルカリホスファターゼ活性をジオキセタン誘導体を基質として用いて測定することができる。

#### (作用)

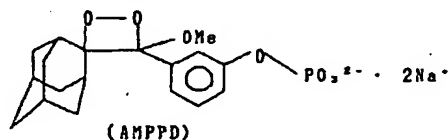
本発明は、酵素反応をさせた際に存在した固相を更に、その固相のみを更にアルカリ条件とすることにより発光反応させ得られる化学発光を用いる。

#### 実施例1

##### (TSHの測定)

15μlのTSHを含むサンプル2μl/μlに抗TSH Fab'を結合したアルカリホスファターゼコンジュゲート135μl(コンジュゲート濃度0.5μg/μl、0.1Mトリス塩酸、2%BSA、1mM MgCl<sub>2</sub>、0.1mM ZnCl<sub>2</sub>、pH7.5)を混合し、これに抗TSHマウスIgGをコートしたポリスチレンビーズ1個(直径1/8インチ)添加し、室温で2時間放置した。このビーズを蒸留水で3回洗浄し、3-(2'-スビロアダマンタン)-4-

-メトキシ-4-(3'-ホスホリルオキシ)フェニル-1,2-ジオキセタン・2ナトリウム塩(以下AMPPDと記す。)



100μg/μlを含む基質液(0.1Mトリス塩酸、1mM MgCl<sub>2</sub>、0.1mM ZnCl<sub>2</sub>、pH9.8)200μlを加え、室温で20分間反応させた。このビーズを蒸留水1μlで3回洗浄し、ついでpH8.0~14.0の各アルカリ溶液を200μl添加し、ただちにルミノメーター(ベルトールド社製)で発光量をカウントし、10秒間の積算値を求めた。

その結果を第1図に示す。

#### 実施例2

##### (洗浄回数によるTSH測定への影響)

20μlのTSHを含むサンプル(0, 0.5, 2, 10, 20μU/μl)に抗TSH Fab'を結合したアルカリホスファターゼコンジュゲート300μl(コ

ンジュゲート濃度  $0.5 \mu\text{g} / \text{ml}$ 、 $0.1 \text{M}$  トリス塩酸、 $2\%$  BSA、 $1 \text{mM}$   $\text{MgCl}_2$ 、 $0.1 \text{mM}$   $\text{ZnCl}_2$ 、 $\text{pH}$  7.5) を混合し、これに抗TSH マウスIgG をコートしたポリスチレンビーズ1個 (直径1/4 インチ) を添加し、室温で2時間放置した。このビーズを蒸留水で3回洗浄し、AMPPD  $100 \mu\text{g} / \text{ml}$  を含む基質液 ( $0.1 \text{M}$  トリス塩酸、 $1 \text{mM}$   $\text{MgCl}_2$ 、 $0.1 \text{mM}$   $\text{ZnCl}_2$ 、 $\text{pH}$  9.8)  $200 \mu\text{l}$  を加え室温で20分間反応させた。このビーズを蒸留水  $2 \text{ml}$  で1~10回洗浄し、さらにビーズに  $4 \text{N}$ -NaOH  $300 \mu\text{l}$  ( $\text{pH}$  13.5) を加え、ただちにルミノメーター (ベルトールド社製) で発光量をカウントし、10秒間の積算値を求めた。

その結果を第2図に示す。

#### 実施例3

(DMSO添加TSH の測定)

$20 \mu\text{l}$  のTSH を含むサンプル ( $0$ 、 $1$ 、 $10 \mu\text{U} / \text{ml}$ ) に抗TSH Fab' を結合したアルカリホスファターゼコンジュゲート  $300 \mu\text{l}$  (コンジュゲート濃度  $0.5 \mu\text{g} / \text{ml}$ 、 $0.1 \text{M}$  トリス塩酸、 $2\%$  BSA

$1 \text{mM}$   $\text{MgCl}_2$ 、 $0.1 \text{mM}$   $\text{ZnCl}_2$ 、 $\text{pH}$  7.5) を混合し、これに抗TSH マウスIgG をコートしたポリスチレンビーズ1個 (直径1/4 インチ) を添加し、室温で1時間放置した。このビーズを蒸留水で3回洗浄し、AMPPD  $100 \mu\text{g} / \text{ml}$  を含む基質液 ( $0.1 \text{M}$  トリス塩酸、 $1 \text{mM}$   $\text{MgCl}_2$ 、 $0.1 \text{mM}$   $\text{ZnCl}_2$ 、 $\text{pH}$  9.8)  $300 \mu\text{l}$  を加え室温で20分間反応させた。このビーズを蒸留水で3回洗浄し、乾燥させついで  $2 \text{N}$  NaOH/DMSO の各混合液 (混合比  $2/1$ 、 $1/1$ 、 $1/2$ )  $300 \mu\text{l}$  を添加し、ただちにルミノメーター (ベルトールド社製) で発光量をカウント10秒間の積算値を求めた。その結果を第1表に示す。

第1表 DMSO添加TSH の測定

DMSO %	カウント数/10秒間
0	14,000
33	22,000
50	59,000
66	236,000

#### 実施例4

(各種ビーズを用いたEIA によるAFP の測定)

$20 \mu\text{l}$  のAFP を含むサンプル ( $1 \text{ng} / \text{ml}$ ) に抗AFP Fab' を結合したアルカリホスファターゼコンジュゲート  $300 \mu\text{l}$  (コンジュゲート濃度  $0.5 \mu\text{g} / \text{ml}$ 、 $0.1 \text{M}$  トリス塩酸、 $2\%$  BSA、 $1 \text{mM}$   $\text{MgCl}_2$ 、 $0.1 \text{mM}$   $\text{ZnCl}_2$ 、 $\text{pH}$  7.5) を混合し、これに抗AFP マウスIgG をコートしたポリスチレン、ポリフルオロエチレン、ポリアクリロニトリル、ビーズ1個 (直径1/4 インチ) を添加し、室温で2時間放置した。このビーズを蒸留水で3回洗浄し、AMPPD  $100 \mu\text{g} / \text{ml}$  を含む基質液 ( $0.1 \text{M}$  トリス塩酸、 $1 \text{mM}$   $\text{MgCl}_2$ 、 $0.1 \text{mM}$   $\text{ZnCl}_2$ 、 $\text{pH}$  9.8)  $200 \mu\text{l}$  を加え室温で20分間反応させた。このビーズを蒸留水で3回洗浄後、 $4 \text{N}$  NaOH、 $300 \mu\text{l}$  と蒸留水  $100 \mu\text{l}$  とを加えたただちにルミノメーター (ベルトールド社製) で発光量をカウントし、100秒間の積算値 (B) を求めた。対照として  $4 \text{N}$ -NaOH を加えず蒸留水だけを添加したときの値 (A) を求め、各ビーズにおける増幅率を求めた。

結果を第2表に示す。

第2表 各種ビーズを用いたAFPの測定

ビーズ	蒸留水添加時の カウント数(A)	4N NaOH300 $\mu$ l 添加時のカウント数(B)	増幅率 (A)/(B)
ポリスチレン 1/4インチ 明和#80	950	12,830	13.5
#280	1090	26,710	24.5
#0	890	5,990	6.7
セキスイ#280	1150	67,650	58.8
1/8インチ明和#80	240	7,260	30.3
ポリフルオロエチレン 1/4インチ#80	910	5,020	5.5
#0	380	860	2.3
ポリアクリロニトリル 1/4インチ#0	790	1,130	1.4
ジュラゴン 1/4インチ#0	880	2,290	2.6
ポリメチルペンチン 1/4インチ#0	880	2,470	2.8

## 実施例6

(有機溶媒中での増感発光免疫測定法)

TSH (0.5  $\mu$ U /  $\mu$ l) を含むサンプル 50  $\mu$ l を試験管に取り、抗 TSHマウスIgG 感作ビーズ1個を加え、続いて抗 TSHマウスIgG Fab 結合アルカリフォスファターゼ (0.08  $\mu$ g /  $\mu$ l) を 400  $\mu$ l 添加した。室温で30分放置し、生理食塩水で4回洗浄し、100  $\mu$ g /  $\mu$ l の AMPPD を含む 0.1 M トリス-HCl 緩衝液 (pH 9.8) 200  $\mu$ l 加えた。20分後、この上清を吸引除去し蒸留水で2回洗浄した。完全に蒸留水を除去し、これにクロロホルム、ベンゼン、ベンジルアルコール、メタキシレン、あるいはジメチルスルホキシド溶液 (0.01% ナトリウムメチラート含有) を 1000  $\mu$ l 加え、その10秒間の発光量を計測した。表3は各有機溶媒で発光させたときの発光量を示している。

## 実施例5

(卵白アルブミン添加による固相発光EIAの増感法)

APP (0.5 ng /  $\mu$ l) を含むサンプル 50  $\mu$ l を試験管に取り、抗 APPマウスIgG 感作ビーズ1個を加え、続いて抗 APPマウスIgG Fab 結合アルカリフォスファターゼ (0.08  $\mu$ g /  $\mu$ l) を 400  $\mu$ l 添加した。室温で30分放置し、生理食塩水で4回洗浄し、100  $\mu$ g /  $\mu$ l の AMPPD を含む 0.1 M トリス-HCl 緩衝液 (pH 9.8) 200  $\mu$ l 加えた。20分後、この上清を吸引除去し蒸留水で2回洗浄した。

このビーズに 0 ~ 20 ng /  $\mu$ l の蛋白溶液 100  $\mu$ l、更に 4 N NaOH 1000  $\mu$ l を加え、その5秒間の発光量を計測した。蛋白として BSA、BSA、ヒトIgG あるいは卵白アルブミンを用いた。第3図はその蛋白濃度と発光量の関係を示している。

表3 各種有機溶媒を用いたときの発光量

溶媒	発光半減期 (t/2) (分)	積算値 (カウント/10秒)	全積算値 の相対比
クロロホルム	2	$0.75 \times 10^5$	1
ベンゾアルコール	11	$1.9 \times 10^5$	13.67
キシレン	3.7	$8.0 \times 10^5$	19.80
n-キシレン	2.8	$9.8 \times 10^5$	18.33

\* t/2 : 発光半減期

積算値 : 10秒間の積算値

相対比 : 積算値の相対積算値

(クロロホルムを1とした場合)

## 実施例7

(ヒト肝炎B型ウイルス表面抗原 (HBVs) DNA の検出)

HBVs DNA (100, 10, 1, 0.1  $\mu$ g /  $\mu$ l) を等量の 0.6N NaOH を添加することにより変性させ、弱く吸引することによりナイロンメンブラン (Hybond-N、アマシャム社製) にブロットした。このメンブランを 2 M アンモニアおよび 5 x SSC

で洗浄後、このDNAをUV照射によりメンブランに固定した。固定化したメンブランをブレイブリダイゼーション緩衝液(5×ssc、5×デンハート溶液、0.1% SDS)で15分間、50℃でインキュベートした。この溶液2 mlに10 μlのプローブDNA(アルカリ性ホスファターゼ標識オリゴヌクレオチドDNA、Dupont社製)を加え、50℃で30分間ハイブリダイゼーションした。その後、このメンブランを1×ssc、1% SDSを含む溶液で1回につき室温で5分間浸して2回洗浄し、更に1×ssc、1% Triton X-100を含む溶液で1回につき50℃で5分間浸して2回洗浄した。

最後にこのメンブランを攪拌しながら1×sscを含む溶液で1回につき室温で5分間浸して2回洗浄した。アルカリ性ホスファターゼの活性測定はAMPPD(100 μg/ml)およびBDHQ(0.02%)を含む基質液を用い室温で5分間浸すことにより行い、5分後にこのメンブランを0.01 Mリン酸1×MEDTA pH 6.0に浸して洗浄し、更にこのメンブランを1 N NaOH溶液に浸した。その後、直

ちにX線フィルムにこのメンブランを3分間感光させた。対照として0.1 M EDTA溶液(pH 5.2)に浸し、フィルムに感光させた。表5はそのときの各濃度に対する感光スポットを示している。

表 5

BBV conc.	10 pg	100 pg	1000 pg
NaOH(-)	-	-	+
NaOH(+)	+	#	#

(-) 目で判定できない。

(+) 目で感光スポットをよみとれる。

(#) 目でスポットが黒くよみとれる。

(\*) スポットが広く外部に及んでいる。

(発明の効果)

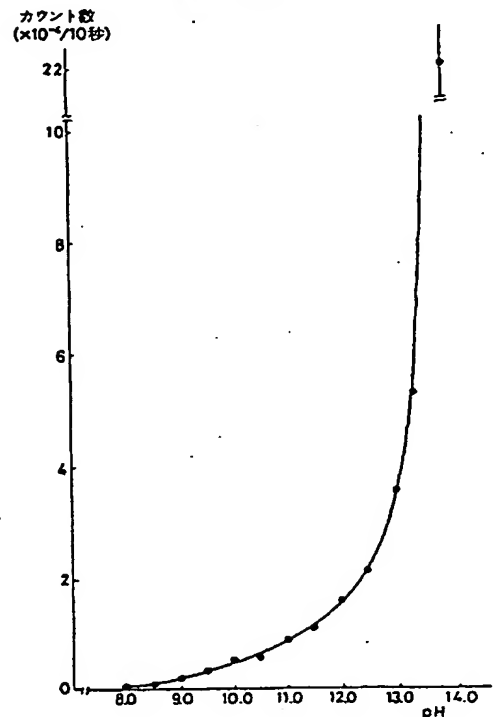
本発明は、酵素反応させ、更に固相のみをアルカリ条件とすることにより生ずる発光反応を組合せた化学発光測定法である。極めて多量の光量を得ることができるため高感度、高精度の測定ができる。又、発光を任意の時間及び場所で行なわせることもできるため極めて有用な測定法である。

#### 4. 図面の簡単な説明

第1図はpHを変化させた時の発光量を示したものであり、第2図は、洗浄回数による影響を示したものであり、第3図は固相発光時に蛋白とNaOHを添加した時の発光量を示す図である。

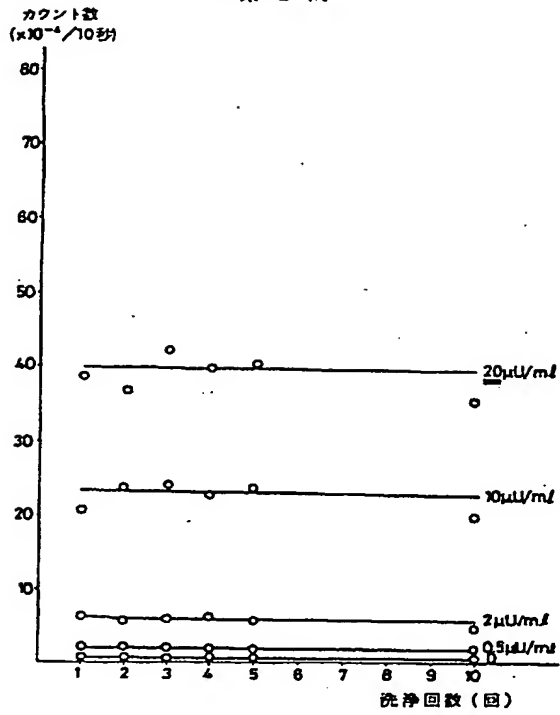
特許出願人 富士レビオ株式会社

第 1 図





第 2 図



第 3 図

